

**UNIVERSIDADE FEDERAL DA PARAÍBA
CENTRO DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS**

**AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIMICROBIANA DOS
EXTRATOS DE *Hamamelis virginiana* L.**

**Valeska Farias Serafim
Bióloga**

2016

UNIVERSIDADE FEDERAL DA PARAÍBA
CENTRO DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS

**AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIMICROBIANA DOS
EXTRATOS DE *Hamamelis virginiana* L.**

Valeska Farias Serafim

Orientador: Profa. Dra. Suzana Aparecida Costa de Araújo

Coorientador: Prof. Dr. Danilo Tancler Stipp

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciência Animal do Centro de Ciências Agrárias da Universidade Federal da Paraíba, como parte das exigências para a obtenção do título de Mestre em Ciência Animal.

2016

VALESKA FARIAS SERAFIM

**AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIMICROBIANA DOS
EXTRATOS DE PRÓPOLIS E *Hamamelis virginiana***

Dissertação apresentada ao
Programa de Pós-Graduação em
Ciência Animal do Centro de Ciências
Agrárias da Universidade Federal da
Paraíba, como parte das exigências
para a obtenção do título de Mestre
em Ciência Animal. Área de
Concentração Saúde Animal do brejo
paraibano.

APROVADA EM 24/02/2016

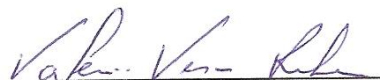
BANCA EXAMINADORA



Profa. Dra. Suzana Aparecida Costa de Araújo
DCV/CCA/UFPB
Orientador



Profa. Dra. Anne Evelyne Franco de Souza
DCV/CCA/UFPB
Examinador



Profa. Dra. Valéria Veras Ribeiro
CCBS/UEPB
Examinador

DADOS CURRICULARES DA AUTORA

VALESKA FARIAS SERAFIM - Nascida em 29 de julho de 1988, no município de Campina Grande, Estado da Paraíba. Ingressou no curso de Ciências Biológicas na Universidade Federal da Paraíba (UFPB), Campus de Areia, em 2006. No mesmo campus, em 2007, estagiou no Laboratório de Microbiologia, e, em 2010, foi Monitora Voluntária de Bioestatística. Iniciou o curso de mestrado em Ciência Animal pelo Programa de Pós-Graduação em Ciência Animal (PPGCAn) da Universidade Federal da Paraíba (UFPB), Campus de Areia, em março de 2014.

EPÍGRAFE

"O sucesso nasce do querer, da determinação e persistência em se chegar a um objetivo. Mesmo não atingindo o alvo, quem busca e vence obstáculos, no mínimo fará coisas admiráveis."

José de Alencar

DEDICATÓRIA

À minha família, que nunca mediu esforços para estar ao meu lado, ensinando-me que todos os meus sonhos podem se tornar realidade.

AGRADECIMENTOS

A Deus, criador de tudo e de todos, pelos dons do Espírito Santo que são derramados a cada dia, dando-me fortaleza, paciência e sabedoria para enfrentar e superar os diversos obstáculos que a vida impõe.

À minha família e ao meu noivo Helder Camilo, por se fazerem presentes sempre que precisei, principalmente nos momentos em que pensei em desistir.

Aos meus amigos e amigas, pelos ótimos momentos vividos durante o curso.

À Suzana Aparecida Costa de Araújo, minha orientadora, pela atenção e dedicação prestadas nas diversas fases da pesquisa.

Aos professores do Programa de Pós Graduação em Ciência Animal que transmitiram seus conhecimentos valiosos.

A todos que diretamente ou indiretamente ajudaram na realização e conclusão deste estudo.

SUMÁRIO

| | Página |
|---|--------|
| RESUMO GERAL..... | xi |
| ABSTRACT..... | xii |
| CONSIDERAÇÕES GERAIS..... | 13 |
| 1.CONHECIMENTO TRADICIONAL EM USO DE PLANTAS..... | 13 |
| 2.PLANTAS COMO FONTE TERAPÊUTICA NATURAL..... | 14 |
| 2.1. <i>Hamamelis virginiana</i> L. | 15 |
| 3.RESISTÊNCIA BACTERIANA..... | 15 |
| 3.1. <i>Staphylococcus aureus</i> | 16 |
| 3.2. <i>Escherichia coli</i> | 17 |
| CAPÍTULO I..... | 18 |
| AVALIAÇÃO DA AÇÃO ANTIBACTERIANA DO EXTRATO GLICÓLICO DE <i>Hamamelis virginiana</i> L. | 19 |
| INTRODUÇÃO..... | 20 |
| MATERIAIS E MÉTODOS..... | 21 |
| RESULTADOS E DISCUSSÃO..... | 23 |
| CONCLUSÃO..... | 24 |
| REFERÊNCIAS..... | 24 |
| REFERÊNCIAS..... | 26 |

LISTA DE TABELAS

Página

Tabela 1.

| | |
|---|----|
| Esquema de diluição da substância teste (extrato glicólico da <i>Hamamelis virginiana</i> L, Pharmanostra [®] , Brasil) em placa de microdiluição..... | 22 |
|---|----|

AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIMICROBIANA DO EXTRATO DE *Hamamelis virginiana* L.

RESUMO GERAL – Diversas plantas possuem efeitos antimicrobianos, podendo representar uma alternativa terapêutica para variadas doenças infecciosas. O objetivo do trabalho foi avaliar *in vitro* a atividade antibacteriana dos extratos glicólicos de própolis e de *Hamamelis virginiana* L. frente a cepas padrões de *Staphylococcus aureus* (ATCC 25923) e *Escherichia coli* (ATCC 25922). A Concentração Inibitória Mínima (CIM) e a Concentração Bactericida Mínima (CBM) foram determinadas através de testes de microdiluição em caldo Muller Hinton, sendo as drogas preparadas em dimetilsulfóxido (DMSO) e o inóculo padronizado para corresponder a 0,5 da escala de McFarland (10^6 UFC/ml). As Concentrações Inibitórias Mínimas e as Concentrações Bactericidas Mínima do extrato de *Hamamelis virginiana* L. foram, respectivamente, para *S. aureus* 100 µg/ml e 200 µg/ml, e para *E. coli* 200 µg/ml e 250 µg/ml. Nas condições experimentais do estudo, os extratos apresentaram atividade antibacteriana sobre as cepas *S. aureus* e *E. coli*.

Palavras-chave: *Escherichia coli*; fitoterapia; microdiluição; planta medicinal; *Staphylococcus aureus*; susceptibilidade antimicrobiana.

EVALUATION OF ANTIMICROBIAL *Hamamelis virginiana* L. EXTRACT ACTIVITY

ABSTRACT – Several plants have antimicrobial effects, which may represent an alternative therapy for various infectious diseases. The objective was to evaluate the in vitro antibacterial activity of glycolic extracts of propolis and *Hamamelis virginiana* L. against strains patterns of *Staphylococcus aureus* (ATCC 25923) and *Escherichia coli* (ATCC 25922). The Minimum Inhibitory Concentration (MIC) and Minimum Bactericidal Concentration (MBC) were determined by broth microdilution tests on Müller Hinton broth, and the drugs prepared in dimethylsulfoxide (DMSO) and standardized inoculum to be 0.5 of the McFarland scale (106 CFU / ml). The Minimum Inhibitory Concentrations and Minimum Bactericidal Concentrations *Hamamelis virginiana* L. extract were respectively for *S. aureus* 100 ug / ml and 200 ug / ml and *E. coli* 200 ug / ml and 250 ug / ml. In the tested experimental conditions, the extracts showed antibacterial activity against the strains *S. aureus* and *E. coli*.

Keywords: antimicrobial susceptibility; *Escherichia coli*; medicinal plant; microdilution; Phytotherapy; *Staphylococcus aureus*.

CONSIDERAÇÕES GERAIS

1. CONHECIMENTO TRADICIONAL NO USO DE PLANTAS

A utilização de plantas e substâncias antimicrobianas na medicina veterinária e humana antecedeu a descoberta de espécies microbianas, uma vez que Hipócrates (460-337a.C.), “Pai da Medicina”, recomendava a lavagem de ferimentos com vinho para impedir o processo infeccioso.

Duarte (2006), em seus estudos, relata a existência de registros históricos datados desde 4.000 a.C. que comprovam a utilização de plantas na busca pela cura de enfermidades nos diferentes povos da antiguidade. O autor observou que na Ásia, África e América Latina, ainda existe uma dependência com a medicina alternativa como solução de problemas de saúde da população. No Brasil, tanto nas pequenas quanto nas grandes cidades, comumente é visto o comércio de plantas medicinais em feiras livres, mercados populares ou ainda o cultivo de plantas nos quintais das casas.

Em seus estudos antropológicos, Sanches (2004), relata documentos datados com aproximadamente 3.000 anos mostrando que alguns povos, como chineses e indianos, utilizavam mofo, papa de soja e produtos semelhantes para o tratamento de lesões infectadas e processos inflamatórios.

Dessa forma, percebe-se que desde os primórdios das civilizações, as plantas e seus derivados têm sido utilizados não só como fonte de alimento, mas também como fonte de medicamento contra enfermidades. Segundo Lima (2001), diversificadas doenças eram tratadas com chás, sucos, tinturas, banhos, cataplasmas e unguentos, preparados a partir de partes de plantas. A referida conduta terapêutica remonta, principalmente, aos antigos povos asiáticos e europeus, onde estudiosos, com base em seus conhecimentos classificaram inúmeras espécies vegetais, com a respectiva indicação do uso medicinal. Vale ressaltar que até a atualidade vários povos ainda utilizam esses meios para o tratamento de algumas doenças.

Após a descoberta da penicilina, a busca de substâncias antimicrobianas a partir de plantas ganhou grande impulso. As mesmas originam compostos como

alcalóides, flavonóides, isoflavonóides, terpenos, poliacetilenos e óleos, que, cujas funções, até pouco tempo, eram desconhecidas (LIMA, 2001).

O conhecimento acumulado durante o passar dos séculos continua sendo bastante valioso para as gerações atuais, fornecendo pistas sobre substâncias potencialmente úteis no desenvolvimento de novos fármacos baseado em observações feitas em diversas áreas como Química, Bioquímica, Botânica, Farmacologia e Antropologia (FABRICANT e FARNSWORTH, 2001).

No contexto brasileiro, a busca e o estudo das plantas medicinais não fugiu a regra dos países europeus e asiáticos. O Brasil conta com a maior biodiversidade de plantas em todo mundo, chegando a aproximadamente 20% do número total de espécies do planeta (CARVALHO et al., 2007). De acordo com o mesmo autor, aproximadamente 48% dos medicamentos empregados na terapêutica advêm, direta e indiretamente, de produtos naturais, em especial de plantas medicinais.

2. PLANTAS COMO FONTE TERAPÊUTICA NATURAL

Segundo a Organização Mundial de Saúde (2002), planta medicinal é “todo e qualquer vegetal que possui, em um ou mais órgãos, substâncias que podem ser utilizadas com fins terapêuticos ou que sejam precursores de fármacos semissintéticos”. A OMS reconhece a importância do potencial terapêutico das plantas, porém adverte quanto ao uso e preparo inadequado, recomendando cuidados para possíveis efeitos colaterais.

É possível isolar das plantas uma variedade de compostos químicos com propriedades antimicrobianas e antifúngicas e este fato, nos últimos anos vêm despertando um enorme interesse nos cientistas em conseguir produzir novas drogas antimicrobianas mais seguras e potentes e totalmente eficazes contra patógenos resistentes (AHMAD e BEG, 2001).

A capacidade terapêutica de substâncias advindas de vegetais é atribuída à capacidade das plantas em sintetizar substâncias químicas, chamadas de metabólitos secundários. Estes conferem as plantas vantagens adaptativas, participando de mecanismos de defesa desenvolvidos para a sobrevivência das

plantas, atuando diretamente sobre agentes patogênicos, predadores e polinizadores (SALISBURY e ROSS, 1992).

Os antibióticos advindos de vegetais possuem uma estrutura química que diferem dos antibióticos derivados de microrganismos, podendo regular o metabolismo intermediário dos patógenos, ativando ou bloqueando as reações de síntese enzimática ou mesmo alterando a estrutura de membranas (MICHELIN et al., 2005).

2.1. *Hamamelis virginiana*

A espécie *Hamamelis virginiana* L. pertence à família das *Hamamelidaceae* sendo popularmente conhecida como hamamelis, hamamélia, hamamelis-da-virginia, vara mosqueada, nogueira-de-bruxas, amieiro-nosqueado, aveleira-de-bruxa, aveleira-de-feiticeira, flor-do-inverno, vassoura-de-bruxa. É um arbusto ou árvore pequena, com altura entre 1,5 a 3,5 metros, que floresce no outono, nativa dos bosques úmidos da parte oriental da América do norte, desde New Brunswick e Quebec até Minnesota, sul da Flórida, Geórgia, Louisiana e Texas (LEUNG e FOSTER, 1996).

É utilizada na medicina popular por apresentar, dentre outras ações, as propriedades anti-inflamatória, antiviral, adstringente, antioxidante e antimicrobiana. Apresenta como princípios ativos os flavonoides e taninos (FAIVRE et al., 2009).

3. RESISTÊNCIA BACTERIANA

Com o desenvolvimento dos quimioterápicos, as doenças bacterianas foram facilmente controladas, não representando riscos aos humanos e animais, contudo, pouco tempo depois começaram a surgir microrganismos que apresentavam resistência às drogas e sobreviviam aos tratamentos, causando assim, um problema mundial.

Couto (2003) em seus estudos define bactérias ou germes multirresistentes como sendo “os microrganismos que apresentam resistência à maioria dos antimicrobianos para os quais esses germes são originalmente sensíveis”. Essa

resistência observada é resultado do uso indiscriminado e irresponsável de antibióticos, na terapia ou profilaxia, favorecendo a seleção e predominância de espécies bacterianas cada vez mais resistentes (DEL FIOLE et. al., 2010).

Segundo Ngowke e seus colaboradores (2011), “a epidemiologia da resistência aos antibióticos varia de acordo com a região e com o país”, sendo evidente que o aumento ou a diminuição de cepas resistentes tem sempre uma ligação direta com o uso indiscriminado de antibióticos.

A aquisição de resistência aos antimicrobianos trata-se de um fenômeno genético, relacionado com alterações de genes contidos nos microrganismos, que codificam diferentes mecanismos bioquímicos que impedem a ação das drogas. Os mecanismos de ação podem estar relacionados na interferência na síntese da parede celular, na inibição da síntese de proteínas, na interferência na síntese de ácido nucléico, na diminuição da permeabilidade ao agente antimicrobiano e/ou na destruição da estrutura da membrana celular (TENOVER, 2006).

A resistência bacteriana pode surgir através de mutação ou por aquisição de material genético de outras bactérias. Os genes que codificam proteínas envolvidas nos mecanismos de resistência podem estar localizados no cromossomo ou em elementos extra cromossomais, com os plasmídeos, os transposons e os integons, que se movimentam com facilidade de uma cepa para outra, de uma espécie para outra, ou mesmo de um gênero a outro (ROSSI e ANDREAZI, 2005).

Mesmo ocorrendo o surgimento de novos antibióticos no mercado farmacêutico, a resistência bacteriana cresce em ritmo acentuado, observando que tal fenômeno pode ocorrer tanto em bactérias Gram positivas quanto Gram negativas, sendo estas últimas mais resistentes devido à presença de uma membrana externa que as protege mais efetivamente, representando um grande desafio terapêutico (ROSSI e ANDREAZI, 2005).

3.1. *Staphylococcus aureus*

O gênero *Staphylococcus* pertence à família Micrococcaceae. Atualmente, o gênero *Staphylococcus* possui 33 espécies, sendo a principal espécie deste gênero o *S. aureus*, bactéria Gram positiva, que tem a forma esférica, cerca de 1 µm de

diâmetro, e formam grupos com aspecto de cachos de uvas. São amplamente distribuídos na natureza e fazem parte da microbiota normal da pele e mucosas (TRABULSI & ALTERTHUM, 2005).

S. aureus produz muitas toxinas que contribuem para a patogenicidade da espécie, aumentando a habilidade de invadir o corpo e danificar tecidos. Dessa forma, é responsável por diferentes tipos de infecções, sendo a maioria ocorridas na pele e tecidos moles, é também o agente etiológico causador das formas graves de pneumonia, endocardites e sepses (MENEGOTTO e PICOLI, 2007). O mesmo apresenta uma grande variação no grau de sensibilidade a antimicrobianos de amplo espectro de ação, como, por exemplo, *Staphylococcus aureus* intermediário a vancomicina (VISA), *Staphylococcus aureus* resistente a metilicina/oxacilina (MRSA/ORSA).

3.2. *Escherichia coli*

O gênero *Escherichia* compreende bactérias Gram negativas, em forma de bastão, pertencentes à família *Enterobacteriaceae*, classificadas como anaeróbias facultativas (FERREIRA e KNÖBL, 2009). A *Escherichia coli* é a espécie de maior importância prática e estudada, por estar presente nos animais, constituindo parte da microbiota normal do trato intestinal (MÂCEDO et. al., 2012).

A espécie *E. coli* é constituída por uma grande variedade de cepas patogênicas, causando enfermidades tais como infecções urinárias e intestinais, septicemias, meningites e outros tipos de infecção por possuir fatores específicos de patogenicidade (MOURA e FERNANDES, 2010).

Em virtude do aumento da resistência bacteriana aos antibióticos existentes, surge uma nova perspectiva na procura de medicamentos, sendo as plantas medicinais a principal fonte para a obtenção dos mesmos. Dessa forma, objetivou-se avaliar *in vitro* a atividade antimicrobiana do extrato glicólico de *Hamamelis virginiana* L. frente cepas de *Staphylococcus aureus* e *Escherichia coli*.

CAPÍTULO I

Avaliação da ação antibacteriana do extrato glicólico de *Hamamelis virginiana* L.

**AVALIAÇÃO DA AÇÃO ANTIBACTERIANA DO EXTRATO GLICÓLICO DE
Hamamelis virginiana L.**

**ANTIBACTERIAL EVALUATION OF GLYCOLIC EXTRACT OF *Hamamelis
virginiana* L.**

SERAFIM, V.F.⁽¹⁾; ARAÚJO, S.A.C.⁽¹⁾; PEREIRA, H.C.S.⁽¹⁾

⁽¹⁾ Departamento de Ciências Veterinárias, Centro de Ciências Agrárias, Universidade Federal da Paraíba, Campus II, CEP 58397-000, Areia, PB, Brasil. Email: valeska-fs@hotmail.com; suzanaaraujo@gmail.com; psicologohelder@hotmail.com

RESUMO

A avaliação da atividade antibacteriana da *Hamamelis virginiana*, frente a cepas padrões de *Staphylococcus aureus* (ATCC 25923) e *Escherichia coli* (ATCC 25922), foi feita através do método de microdiluição, determinando a Concentração Inibitória Mínima (CIM) e a Concentração Bactericida Mínima (CBM). Às concentrações inibitórias mínimas (CIM) e as concentrações bactericidas mínimas (CBM) foram, respectivamente, para *S. aureus* 100 µg/ml e 200 µg/ml, e para *E. coli* 200 µg/ml e 250 µg/ml. Nas condições experimentais, o extrato de *Hamamelis virginiana* L. apresentou atividade antibacteriana frente às cepas bacterianas em teste.

Palavras-chaves: microdiluição; planta medicinal; susceptibilidade antimicrobiana.

ABSTRACT

Evaluation of the antibacterial activity of *Hamamelis virginiana*, compared to standard strains of *Staphylococcus aureus* (ATCC 25923) and *Escherichia coli* (ATCC 25922), was performed using the microdilution method, determining the Minimum Inhibitory Concentration (MIC) and Minimum Bactericidal Concentration (MBC). The Minimum Inhibitory Concentrations (MIC) and Minimum Bactericidal Concentrations (MBC) were respectively for *S. aureus* 100

ug / ml and 200 ug / ml and E. coli 200 ug / ml and 250 ug / ml. Under the experimental conditions, *Hamamelis virginia* L. extract showed antibacterial activity against bacterial strains in test.

Keywords: antimicrobial susceptibility; medicinal plant; microdilution.

INTRODUÇÃO

Segundo a Organização Mundial de Saúde (2002), planta medicinal é “todo e qualquer vegetal que possui, em um ou mais órgãos, substâncias que podem ser utilizadas com fins terapêuticos ou que sejam precursores de fármacos semissintéticos”. A OMS reconhece a importância do potencial terapêutico das plantas, porém adverte quanto ao uso e preparo inadequado, recomendando cuidados para possíveis efeitos colaterais.

É possível isolar das plantas uma variedade de compostos químicos com propriedades antimicrobianas e este fato, nos últimos anos, vêm despertando um enorme interesse nos cientistas em conseguir produzir novas drogas antimicrobianas mais seguras e potentes e totalmente eficazes contra patógenos resistentes (Ahmad e Beg, 2001).

A capacidade terapêutica de substâncias advindas de vegetais é atribuída à capacidade das plantas em sintetizar substâncias químicas, chamadas de metabólitos secundários. Estes conferem às plantas vantagens adaptativas, participando de mecanismos de defesa desenvolvidos para a sobrevivência, atuando diretamente sobre agentes patogênicos, predadores, e também polinizadores (Salisbury e Ross, 1992).

Os antibióticos advindos de vegetais possuem uma estrutura química que difere dos antibióticos derivados de microrganismos, podendo regular o metabolismo intermediário dos patógenos, ativando ou bloqueando as reações de síntese enzimática ou mesmo alterando a estrutura de membranas (Michelin et al., 2005).

Objetivou-se nesse trabalho avaliar *in vitro* a atividade antimicrobiana do extrato glicólico de *Hamamelis virginiana* frente cepas Gram-positivas e Gram-negativas, respectivamente, representadas pelo *Staphylococcus aureus* e *Escherichia coli*.

MATERIAL E MÉTODOS

O estudo em questão trata-se de uma pesquisa laboratorial, tendo enfoque experimental, medindo parâmetros quantitativos, sendo desenvolvida no período de maio a outubro de 2015.

O extrato usado nas análises, extrato glicólico da *Hamamelis virginiana* L, (Pharmanostra[®], Brasil) foi adquirido comercialmente.

No estudo foram utilizadas cepas padronizadas de bactérias *Staphylococcus aureus* (ATCC[®] 25923TM), e *Escherichia coli* (ATCC[®] 25922TM), cedidas pelo Laboratório de Avaliação de Produtos de Origem Animal (Lapoa), localizado no Centro de Ciências Agrárias (CCA), da Universidade Federal da Paraíba (UFPB), Campus II – Areia, PB, Brasil. Empregaram-se cultivos bacterianos, com 18-24 horas de incubação em estufa bacteriológica a 37°C. O inóculo foi padronizado para corresponder a 0,5 da escala de McFarland (10⁶ UFC/ml).

No preparo da Solução-Mãe Padrão (SM⁰) foi seguida a proporção de 1mg do extrato/1mL de dimetilsulfóxido (Sigma-Aldrich[®], Brasil). No preparo das SM¹, SM² e SM³ do extrato, a SM⁰ foi diluída em meio líquido (Caldo Mueller Hinton, HIMEDIA[®]), obedecendo as seguintes proporções: SM¹ = 1,5mL do meio líquido/1,5mL da SM⁰, SM² = 2,5mL do meio líquido/0,5mL da SM⁰ e SM³ = 4,5mL de meio líquido/0,5mL da SM⁰, de modo que se obtiveram soluções com diferentes concentrações do extrato.

Para a avaliação da atividade antibacteriana do extrato utilizou-se o método de microdiluição, determinando a Concentração Inibitória Mínima (CIM) e a Concentração Bactericida Mínima (CBM).

As microplacas com 96 orifícios com fundo em “U” foram preparadas de forma que cada poço tivesse um volume final de 100µl. Nos poços foram distribuídas as soluções de forma a conter as diferentes concentrações de extrato em teste. O sistema de diluição foi controlado pelo volume da Solução-Mãe utilizado de acordo com a tabela de microdiluição (Tab. 1), fornecida de forma que se obtivessem diferentes concentrações que variaram de 400 µg/mL até 15 µg/mL. O experimento foi realizado em duplicata.

Tabela 1. Esquema de diluição da substância teste (extrato glicólico da *Hamamelis virginiana* L., Pharmanostra®, Brasil) em placa de microdiluição.

| Solução Mãe | SM (µL) | Inóculo (µL) | Meio (µL) | Qtde. extrato (µg) | Vol. Final (mL) | Conc. Final (µg/ml) |
|-------------|---------|--------------|-----------|--------------------|-----------------|---------------------|
| 1 | 80 | 20 | - | 40 | 0,1 | 400 |
| 1 | 70 | 20 | 10 | 35 | 0,1 | 350 |
| 1 | 60 | 20 | 20 | 30 | 0,1 | 300 |
| 1 | 50 | 20 | 30 | 25 | 0,1 | 250 |
| 1 | 40 | 20 | 40 | 20 | 0,1 | 200 |
| 1 | 30 | 20 | 50 | 15 | 0,1 | 150 |
| 1 | 20 | 20 | 60 | 10 | 0,1 | 100 |
| 2 | 55 | 20 | 25 | 9,185 | 0,1 | 91,85 |
| 2 | 50 | 20 | 30 | 8,35 | 0,1 | 83,5 |
| 2 | 45 | 20 | 35 | 7,515 | 0,1 | 75,15 |
| 2 | 40 | 20 | 40 | 6,68 | 0,1 | 66,8 |
| 2 | 35 | 20 | 45 | 5,845 | 0,1 | 58,45 |
| 3 | 50 | 20 | 30 | 5 | 0,1 | 50 |
| 3 | 45 | 20 | 35 | 4,5 | 0,1 | 45 |
| 3 | 40 | 20 | 40 | 4 | 0,1 | 40 |
| 3 | 35 | 20 | 45 | 3,5 | 0,1 | 35 |
| 3 | 30 | 20 | 50 | 3 | 0,1 | 30 |
| 3 | 25 | 20 | 55 | 2,5 | 0,1 | 25 |
| 3 | 20 | 20 | 60 | 2 | 0,1 | 20 |
| 3 | 15 | 20 | 65 | 1,5 | 0,1 | 15 |

(Adaptado de Andrews, 2001)

Após o preenchimento de todos os poços, as placas foram seladas e incubadas a 37°C por 24 horas. Passado o período de incubação foi realizada a leitura das microplacas.

A CIM foi considerada como a menor concentração que inibiu visivelmente o crescimento bacteriano, levando em consideração a turvação dos poços da placa de microdiluição (NCCLS, 1999).

A CBM foi determinada pelo plaqueamento de 10 µL de amostra de cada concentração do extrato em todas as concentrações do inóculo que antecederam a CIM. A CBM foi considerada a menor concentração que inibiu 99,9% do crescimento bacteriano após subcultivo em meio nutritivo (NCCLS, 1999).

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Após a leitura das placas de microdiluição, observou-se que os valores correspondentes às concentrações inibitórias mínimas (CIM) e as concentrações bactericidas mínimas (CBM), caracterizada pela ausência de turvação, do extrato de *Hamamelis virginiana* L (Pharmanostra®, Brasil) foram, respectivamente, para *S. aureus* 100 µg/ml e 200 µg/ml, e para *E. coli* 200 µg/ml e 250 µg/ml.

No meio científico não existe um consenso sobre a concentração aceitável para produtos vegetais, sendo que alguns autores equiparam para tais resultados similares a de antibióticos conhecidos. Aligianis *et al.* (2001) propuseram uma classificação para materiais vegetais com base nos resultados do CIM, considerando como: forte inibição - CIM até 500 µg/mL; inibição moderada - CIM entre 600 e 1500 µg/mL e como fraca inibição - CIM acima de 1600 µg/mL. Já para Sartoratto *et al.* (2004), uma forte atividade de extratos vegetais seria para valores de CIM entre 50-500 µg/ml, CIM com atividade moderada entre 600-1500 µg/mL e fraca atividade acima de 1500 µg/mL. Critérios alternativos foram descritos por Fabry *et al.* (1998), que consideraram extratos possuindo valores de CIM abaixo de 8000 µg/mL como possuindo atividade antimicrobiana aproveitável. Holetz *et al.* (2002) sugeriram CIM abaixo de 100 µg/mL para forte atividade antimicrobiana, entre 100 e 500 µg/mL moderada atividade, entre 500 a 1000 µg/mL fraca atividade e acima de 1000 µg/mL como sem atividade.

No presente estudo, o extrato de *Hamamelis virginiana* L. demonstrou atividade contra as cepas padrões de *S. aureus* e *E. coli*, contudo, dependendo do critério escolhido o mesmo poderia ser de fraca, moderada a forte atividade antimicrobiana. Evidencia-se, dessa maneira, a necessidade de estudos mais avançados, visando padronizar a concentração aceitável da atividade antimicrobiana de extratos vegetais com potencial de aproveitamento para fitoterápicos ou para pesquisa de novas drogas antimicrobianas.

Na planta *Hamamelis virginiana* L. estão presentes como princípios ativos os flavonóides e taninos (Faivre *et al.*, 2009), sendo esses os responsáveis por ação antibacteriana.

Ebel e Grisebach (1988) retratam que os flavonóides atuam no processo contra microrganismos patogênicos. Estas substâncias promovem uma enorme gama farmacológica de ações bioquímicas, entre as quais atividade anti-inflamatória, antialérgica, antimicrobiana,

anti-helmíntica, hepatoprotetora, antitrombica e antiviral (Bors *et al.*, 1995). Atuam também como inibidores de enzimas bacterianas, e interferem nas suas vias de síntese (Sato *et al.*, 1995; Alcaráz *et al.*, 2000; Àvila, *et al.*, 2008; Li *et al.*, 2012).

Em relação aos taninos, vários estudos relatam sobre suas propriedades promissoras como agentes quimiopreventivos, isso por não causarem efeitos adversos mesmo em doses elevadas (Desphande *et al.*, 1984). O efeito inibitório dos taninos sobre bactérias pode ser explicado por inibição de enzimas microbianas e/ou complexação com os substratos enzimáticos, ação sobre as membranas celulares dos microorganismos ou complexação com íons metálicos diminuindo, assim, a disponibilidade desses elementos essenciais para o metabolismo dos microorganismos (Oliveira *et al.*, 2010).

CONCLUSÃO

Nas condições experimentais do presente estudo, o extrato de *Hamamelis virginia* L. apresentou atividade antibacteriana frente às cepas bacterianas *S. aureus* e *E. coli*.

REFERÊNCIAS

- AHMAD, I; BEG, A. Z. Antimicrobial and phytochemical studies on 45 Indian medicinal plants against multi-drug resistant human pathogens. *J. Ethnopharmacol.*, v.74, p. 113-123, 2001.
- ALCARÁZ, L.E.; BLANCO, S.E.; PUIG, O.N. et al. Antibacterial Activity of Flavonoids Against Methicilin – resistant *Staphylococcus aureus* strains. *J. Theor. Biol.*, v. 205, p. 231-240, 2000.
- ALIGIANIS, N.; KALPOUTZAKIS, E.; MITAKU, S.; CHINO, I. B. Composition and antimicrobial activity of the essential oil of two *Origanum* species. *J. Agric. Food Chem.*, Washington, v. 49, n. 9, p. 4.168-4.170, 2001.
- ANDREWS J.M. Determination of minimum inhibitory concentrations. *J. Antimicrob. Chemother.* v. 48, n. 1, p. 5-16, 2001.

ÁVILA, P.H.; SMÂNIA, E.F.A.; MONACHE, F.D.; JÚNIOR, A. S. Structure – activity relationship of antibacterial chalcones. *Bioorg. Med. Chem.*, v.16, p. 9790-9794, 2008.

BORS, W; MICHEL, C; SCHIKORA, S. Interaction of flavonoids with ascorbate and determination of their univalent redox potentials; a pulse radiolysis study. *Free Radic. Biol. Med.*, v.19, p. 45-52, 1995.

DESPHANDE, S.S.; SATHE, S.K.; SALUNKHE, D.K. Chemistry and safety of plant polyphenols. *Adv. Exp. Med. Biol.*, v.177, p. 457-495, 1984.

EBEL, J; GRISEBACH, H. Defense strategies of soybean against fungus *Phytophthora megasperma* f. sp. glycinea: a molecular analysis. *Trends Biochem. Sci.*, v.13, p. 23-27, 1988.

FABRY, W.; OKEMO, P.O.; ANSORG, R. Antibacterial activity of East African medicinal plants. *J Ethnopharmacol*, v. 60, p. 79-84, 1998.

FAIVRE, C; GHEDIRA, K; GOETZ, P; LE JEUNE, R. *Hamamelis virginiana* L. (*Hamamelidaceae*). *Phytothérapie*, v.7, n.4, p. 215-220, 2009.

HOLETZ, F.B.; PESSINI, G.L.; SANCHES, N.R. et al. Screening of some plants used in the Brazilian folk medicine for the treatment of infectious diseases. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz*, v. 97, n. 7, p. 1027-1031, 2002.

LI, Y.; LUO, Y.; HU, Y. et al. Design, synthesis and antimicrobial activities of nitroimidazole derivatives containing 1,3,4-oxadiazole scaffold as FabH inhibitors. *Bioorg. Med. Chem.*, v.20, p.4316-4322, 2012.

MICHELIN, D. C.; MORESCHI, P. E.; LIMA, A. C.; NASCIMENTO, G. G. F.; PAGANELLI, M. O.; CHAUD, M. V. Avaliação da atividade antimicrobiana de extratos vegetais. *Rev. Bras. Farmacogn.*, v. 15, p. 316-320, 2005.

NCCLS. *Methods for determining bactericidal activity of antimicrobial agents*: approved guideline. Documento M26-A, Estados Unidos, NCLSS, 1999.

OLIVEIRA, I.D.; GUIMARÃES, A.G.; ARAÚJO, A.A.S. *Avaliação da Atividade Biológica do extrato liofilizado da Remirea marítima Aubl.* 2010. 80 f. Dissertação (Mestrado em Ciências). Universidade Federal de Sergipe, São Cristóvão.

ORGANIZACIÓN MUNDIAL DE LA SAÚDE (OMS). *Estratégia de la OMS sobre medicina tradicional 2002-2005*. Ginebra 2002. 67p. Disponível em: <http://www.opas.org.br/medicamentos/site/UploadArq/trm_strat_spam.pdf>. Acesso em: 05 jun. 2015.

SALISBURY, F. B.; ROSS, C. W. *Plant Physiology*. Belmont: Wadsworth Publishing Company, 4ed., 682p., 1992.

SARTORATTO, A.; MACHADO, A.L.M.; DELARMELINA, C. et al. Composition and antimicrobial activity of essential oils from aromatic plants used in Brazil. *Braz. J. Microbiol.*, v. 35, n. 4, p. 275-280, 2004.

SATO, M.; TSUCHIYA, H.; MIYAZAKI, T. et al. Antibacterial activity of hydroxychalcone against methicilin – resistance *Staphylococcus aureus*. *Int. J. Antimicrob. Ag.*, v.6, p. 227 – 231. 1996.

REFERÊNCIAS

AHMAD, I; BEG, A. Z. Antimicrobial and phytochemical studies on 45 Indian medicinal plants against multi-drug resistant human pathogens. **Journal Ethnopharmacology**, v.74, p. 113-123, 2001.

CARVALHO, A.C.B.; NUNES, D.S.G.; BARATELLI, T.G.; SHUQAIR, N.S.M.; NETTO, E.M. Aspectos da legislação no controle dos medicamentos fitoterápicos. **T&C Amazônia**, v.5, n.11, p. 26-32, 2007.

COUTO, R. Bactérias Multirresistentes. In: COUTO, R. C.; PEDROSA, T. M. G.; NOGUEIRA, J. M. **Infecção Hospitalar e Outras Complicações não Infecciosas da Doença**. 3 ed. Rio de Janeiro: Medsi, 2003.

DEL FIOL, F. S.; LOPES, L. C.; TOLEDO, M. I.; BARBERATO-FILHO, S. Perfil de prescrições e uso de antibióticos em infecções comunitárias. **Revista Sociedade Brasileira Medicina Tropical**, v. 43, n. 1, p. 68-72, 2010.

DUARTE, M.C.T. Atividade antimicrobiana de plantas medicinais e aromáticas utilizadas no Brasil. **MultiCiências**, v.7, 2006.

FABRICANT, D.S. & FARNSWORTH, N.R. The value of plants used in traditional medicine for drug discovery. **Environmental Health Perspectives**, v. 109, n. 1, p. 69-75, 2001.

FAIVRE, C; GHEDIRA, K; GOETZ, P; LE JEUNE, R. *Hamamelis virginiana* L. (*Hamamelidaceae*). **Phytothérapie**, v.7, n.4, p. 215-220, 2009.

FERREIRA, A. J. P.; KNOBL, T. Colibacilose. IN: JUNIOR, A. B.; SILVA, E. N.; FÁBIO, J. D.; SESTI, L. ZUANAZE, M. A. **Doença das aves**. 2 ed. Campinas: Fundação APINCO, 2009. p.457-471.

LEUNG, A. Y.; FOSTER, S. **Encyclopedia of common natural ingredients used in food, drugs and cosmetics**. 2ed. New York: John Wiley & Sons, 1996.

LIMA, E. O. Plantas e suas propriedades antimicrobianas: uma breve análise histórica. In: YUNES, R. A.; CALIXTO, J. B. (Orgs.). **Plantas medicinais: sob a óptica da química medicinal moderna**. Chapecó: ARGOS, 2001. p. 483-501.

MÂCEDO, A.R.; LAGE, A.P.; GUEDES, R.M.C. **Deteção de cepas patogênicas pela PCR multiplex e avaliação da sensibilidade a antimicrobianos de**

***Escherichia coli* isoladas de leitões diarreicos.** Engormix. 2012. Disponível em: <<http://pt.engormix.com/MAsuinocultura/administração/artigos/deteção-cepaspatogenicas-pela-t1008/124-p0.htm>> . Acesso em: 10 ago. 2015.

MENEGOTTO, F. R. & PICOLI, S. U. Staphylococcus aureus oxacilina resistente (MRSA): incidência de cepas adquiridas na comunidade (CA-MRSA) e importância da pesquisa e descolonização em hospital. **Revista Brasileira de Análises Clínicas**, v. 39, n. 2, p. 147-50, 2007.

MICHELIN, D. C.; MORESCHI, P. E.; LIMA, A. C.; NASCIMENTO, G. G. F.; PAGANELLI, M. O.; CHAUD, M. V. Avaliação da atividade antimicrobiana de extratos vegetais. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 15, p. 316-320, 2005.

MOURA, L. B.; FERNANDES, M.G. A incidência de infecções urinárias causadas por *E. coli*. **Revista Olhar Científico**, v. 1, n. 2, p. 411-426, 2010.

NGWOKE, K. G.; ODIMEGWU, D. C.; CHARLES O.; ESIMONE, C. C. Antimicrobial natural products. In: Science against microbial pathogens: communicating current research and technological advances. A. **FORMATEx. Microbiology Series**. v. 2, n. 3, p.1011-1026, 2011.

ORGANIZACIÓN MUNDIAL DE LA SAÚDE (OMS). **Estratégia de la OMS sobre medicina tradicional 2002-2005**. Genebra 2002. 67p. Disponível em: <http://www.opas.org.br/medicamentos/site/UploadArq/trm_strat_spam.pdf>. Acesso em: 05 jun. 2015.

ROSSI, F. & ANDREAZZI, D. **Resistência bacteriana: Interpretando o antibiograma**. São Paulo: Atheneu, 2005.

SALISBURY, F. B.; ROSS, C. W. **Plant Physiology**. 4ed. Belmont: Wadsworth Publishing Company, 1992. 682p.

SANCHES, A. C. C. **Estudo farmacognóstico das cascas de *Stryphnodendron obovatum* Benth., atividade antioxidante, antimicrobiana e da ação cicratizante dos seus extratos.** 2004. 214f. Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas) - Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade Estadual Paulista, Araraquara. 2004.

TENOVER, F.C. Mechanisms of antimicrobial resistance in bacteria. **The American Journal of Medicine**, 119 (Suppl. 1), p. S3-S10, 2006.

TRABULSI, L. R.; ALTERTHUM, F. **Microbiologia**. 4. ed. São Paulo: Atheneu, 2005. 697p.